



⑫

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

⑳ Numéro de dépôt : **94420177.1**

⑤① Int. Cl.⁶ : **C12N 15/82, C12N 15/29,
C12N 5/00, C12N 1/21,
A01H 5/00**

㉔ Date de dépôt : **23.06.94**

③① Priorité : **25.06.93 FR 9308029**

④③ Date de publication de la demande :
11.01.95 Bulletin 95/02

⑧④ Etats contractants désignés :
**AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU NL
PT SE**

⑦① Demandeur : **RHONE-POULENC AGROCHIMIE**
14-20, rue Pierre Baizet
F-69009 Lyon (FR)

⑦② Inventeur : **Atanassova, Rossitza**
7B Rue de l'Abreuvoir
F-67000 Strasbourg (FR)

Inventeur : **De Rose, Richard**
216 Rue de St Cyr
F-69009 Lyon (FR)
Inventeur : **Freyssinet, Georges**
21 Rue de Nervieux
F-69450 St. Cyr au Mont d'Or (FR)
Inventeur : **Gigot, Claude**
13A Boulevard Wilson
F-67000 Strasbourg (FR)
Inventeur : **Lebrun, Michel**
224 Rue de St Cyr
F-69009 Lyon (FR)

⑦④ Mandataire : **Chrétien, François et al**
RHONE-POULENC AGROCHIMIE- DPI
B.P. 9163
F-69263 Lyon Cédex 09 (FR)

⑤④ **Séquence d'ADN isolée pouvant servir de zone terminatrice dans un gène chimère utilisable pour la transformation des plantes.**

- ⑤⑦ 1) Gène chimère pour la transformation des plantes.
2) Il comprend au moins, dans le sens de la transcription, une zone promotrice, un transgène et une zone terminatrice, caractérisé en ce que la zone terminatrice est constitué d'au moins un zone terminatrice d'un gène d'histone végétale permettant l'expression de la protéine dans les zones de croissance rapide.
3) Production de plantes transgéniques.

La présente invention concerne l'utilisation de zone terminatrices isolées de gènes transcrits de plantes, de nouveaux gènes chimères les contenant et leur utilisation pour la transformation des plantes.

De nombreux caractères phénotypiques associés à l'expression d'un ou quelques éléments géniques peuvent être intégrés dans le génome de plantes et conférer ainsi à ces plantes transgéniques des propriétés agromonomiques avantageuses. De façon non extensive on peut citer: les résistances à des agents pathogènes des cultures, la résistance à des produits phytosanitaires phytotoxiques, la production de substances à intérêt alimentaire ou pharmacologique. En plus de l'isolement et la caractérisation des éléments géniques codant pour ces différents caractères, une expression appropriée doit être assurée. Cette expression appropriée peut se situer aussi bien au niveau qualitatif que quantitatif. Au niveau qualitatif, par exemple spatial: expression préférentielle dans un tissu particulier, ou temporel: expression inductible. Au niveau quantitatif par la quantité accumulée du produit d'expression du gène introduit. Cette expression appropriée dépend pour une large part de la présence d'éléments géniques de régulation associés aux transgènes, en particulier pour ce qui concerne les éléments quantitatifs et qualitatifs. Parmi les éléments primordiaux assurant cette régulation appropriée, l'utilisation de zones promotrices homologues ou hétérologues, simples ou combinées a été largement décrite dans la littérature scientifique. L'utilisation de zone terminatrice en aval du transgène ont été utilisées a seule fin de mettre une borne permettant d'arrêter le processus de transcription du transgène, sans présupposé quant à leur rôle sur la qualité ou la quantité de l'expression du transgène.

La présente invention concerne l'utilisation de zone terminatrices isolées de gènes transcrits de plantes, de nouveaux gènes chimères les contenant et leur utilisation pour la transformation des plantes. Elle concerne plus particulièrement l'utilisation conjointe de zone terminatrices et de promoteurs isolés d'un même gène transcrit de plantes. Elle permet l'expression appropriée à la fois quantitative et qualitative des transgènes sous le contrôle de ces éléments de régulation génique. Cette expression appropriée obtenue par l'utilisation de la présente invention peut concerner des caractères tels que: la résistance à des agents pathogènes des cultures, la résistance à des produits phytosanitaires phytotoxiques, la production de substances à intérêt alimentaire ou pharmacologique. En particulier, elle permet de conférer aux plantes transgéniques une tolérance accrue à des herbicides par une expression préférentielle, qualitative et quantitative, du produit d'expression des gènes chimères dans les régions de la plante en croissance rapide. Cette expression appropriée particulière du gène de résistance herbicide est obtenue par utilisation conjointe des éléments de régulation promoteur et zone terminatrice du gène d'histone H4A748 d'*Arabidopsis thaliana*. Un tel profil d'expression peut être obtenu pour tous les caractères présentant un intérêt, tels que décrit ci-dessus, avec les éléments de régulation utilisés pour conférer une tolérance herbicide accrue. La présente invention concerne également les cellules végétales transformées à l'aide de ces gènes et les plantes transformées régénérées à partir de ces cellules ainsi que les plantes issues de croisements utilisant ces plantes transformées.

Parmi les produits phytosanitaires utilisés pour la protection des cultures, les produits systémiques sont caractérisés en ce qu'ils sont véhiculés dans la plante après application et, pour certain d'entre eux, s'accumulent dans les parties en croissance rapide, notamment les apex caulinaires et racinaires, provoquant, dans le cas des herbicides, l'altération, jusqu'à la destruction, des plantes sensibles. Pour certain des herbicides présentant ce type de comportement, le mode d'action primaire est connu et résulte d'une inactivation d'enzymes caractérisées impliquées dans des voies de biosynthèse de composés nécessaires au bon développement des plantes cibles. Les enzymes cibles de ces produits peuvent être localisées dans différents compartiments subcellulaire et l'observation du mode d'action de produits connus montre le plus souvent une localisation dans le compartiment plastidial.

La tolérance des plantes sensibles à un produit appartenant à ce groupe d'herbicides, et dont la cible primaire est connue, peut-être obtenue par introduction stable dans leur génome d'un gène codant pour l'enzyme cible, d'origine phylogénétique quelconque, mutée ou non quant aux caractéristiques d'inhibition par l'herbicide du produit de l'expression de ce gène. Une autre approche consiste à introduire de façon stable dans le génome des plantes sensibles un gène d'origine phylogénétique quelconque codant pour une enzyme capable de réaliser une métabolisation de l'herbicide en un composé inactif et non toxique pour le développement de la plante. Dans ce dernier cas, il n'est pas nécessaire d'avoir caractérisé la cible de l'herbicide.

Etant donné le mode de distribution et d'accumulation des produits de ce type dans les plantes traitées, il est intéressant de pouvoir exprimer le produit de la traduction de ces gènes de façon à permettre leur expression préférentielle et leur accumulation dans les régions de la plante en croissance rapide où ces produits s'accumulent. De plus, et dans le cas où la cible de ces produits est localisée dans un compartiment cellulaire autre que le cytoplasme, il est intéressant de pouvoir exprimer le produit de la traduction de ces gènes sous forme d'un précurseur contenant une séquence polypeptidique permettant l'adressage de la protéine conférant la tolérance dans le compartiment adéquat, et en particulier dans le compartiment plastidial.

A titre d'exemple illustrant cette approche on peut citer le glyphosate, le sulfosate ou la fosamétine qui sont des herbicides systémiques à large spectre de la famille des phosphonométhylglycines. Ils agissent es-

sentiellement comme inhibiteurs compétitifs vis à vis du PEP (phosphoénolpyruvate) de la 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS, EC 2.5.1.19). Après leur application sur la plante, ils sont véhiculés dans la plante où ils s'accumulent dans les parties en croissance rapide, notamment les apes caulinaires et racinaires, provoquant l'altération, jusqu'à la destruction, des plantes sensibles.

5 L'EPSPS, cible principale de ces produits est une enzyme de la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques localisée dans le compartiment plastidial. Cette enzyme est codée par un ou des gènes nucléaires et synthétisée sous forme d'un précurseur cytoplasmique puis importée dans les plastes où elle s'accumule sous sa forme mature.

10 La tolérance des plantes au glyphosate et aux produits de la famille est obtenue par l'introduction stable dans leur génome d'un gène d'EPSPS d'origine végétale ou bactérienne, mutée ou non quant aux caractéristiques d'inhibition par le glyphosate du produit de ce gène. Etant donné le mode d'action du glyphosate, il est intéressant de pouvoir exprimer le produit de la traduction de ce gène de façon à permettre son accumulation importante dans les plastes et de plus, dans les régions de la plante en croissance rapide où les produits s'accumulent.

15 Il est connu, par exemple d'après le brevet américain 4 535 060, de conférer à une plante une tolérance à un herbicide du type ci-dessus, en particulier la N-phosphonométhylglycine ou glyphosate, par introduction dans le génome des plantes d'un gène codant pour une EPSPS portant au moins une mutation rendant cette enzyme plus résistante à son inhibiteur compétitif (le glyphosate), après localisation de l'enzyme dans le compartiment plastidial. Ces techniques demandent cependant à être améliorées pour une plus grande fiabilité

20 dans l'emploi de ces plantes lors d'un traitement par ces produits dans des conditions agronomiques.

Dans la présente description, on entend par "plante" tout organisme multicellulaire différencié capable de photosynthèse et par "cellule végétale" toute cellule issue d'une plante et pouvant constituer des tissus indifférenciés tels que des cals, ou des tissus différenciés tels que des embryons ou des parties de plantes ou des plantes ou des semences. On entend par "zone terminatrice" une séquence d'ADN isolée de longueur variable,

25 située en aval de la partie codante ou correspondant à la partie structurale d'un gène transcrit. On entend par gène de tolérance à un herbicide tout gène, d'origine phylogénétique quelconque, codant soit pour l'enzyme cible de l'herbicide, présentant ou non une ou des mutations quant aux caractéristiques d'inhibition par l'herbicide, soit pour une enzyme capable de métaboliser l'herbicide en un composé inactif et non toxique pour la plante. On entend par zones de la plante en croissance rapide, les régions qui sont le siège de multiplications cellulaires importantes, en particulier les régions apicales.

La présente invention concerne la production de plantes transformées ayant notamment une tolérance accrue à des herbicides s'accumulant dans les zones en croissance rapides des plantes traitées, par régénération de cellules transformées à l'aide de nouveaux gènes chimères comportant un gène de tolérance à ces produits. L'invention a également pour objet la production de plantes transformées ayant une tolérance accrue

35 aux herbicides de la famille des phosphonométhylglycines par régénération de cellules transformées à l'aide de nouveaux gènes chimères comportant un gène de tolérance à ces herbicides. L'invention concerne également ces nouveaux gènes chimères, ainsi que des plantes transformées plus tolérantes en raison d'une meilleure tolérance dans les parties en croissance rapide de ces plantes, ainsi que les plantes issues de croisements utilisant ces plantes transformées. Elle a également pour objet de nouveaux zone terminatrices pour

40 la construction des gènes chimères ci-dessus.

Plus particulièrement, l'invention a pour objet un gène chimère pour conférer aux plantes notamment une tolérance accrue vis à vis d'un herbicide ayant pour cible l'EPSPS, comprenant, dans le sens de la transcription, une zone promotrice, une zone peptide de transit, une séquence codant pour une enzyme de tolérance aux produits de la famille des phosphonométhylglycines et une zone terminatrice, caractérisé en ce que la zone

45 terminatrice est constituée d'un fragment d'un zone terminatrice d'un gène d'histone végétale dans une orientation quelconque relativement à son orientation initiale dans le gène duquel il dérive, permettant l'expression préférentielle et l'accumulation de la protéine de tolérance à l'herbicide dans les zones d'accumulation du dit herbicide.

Le gène d'histone, dont est issu le zone terminatrice selon l'invention, provient d'une plante monocotylédone telle que par exemple le blé, le maïs ou le riz ou de préférence d'une plante dicotylédone telle que par exemple la luzerne, le tournesol, le soja, le colza ou de préférence *Arabidopsis thaliana*. On utilise de préférence un gène d'histone du type H3 ou de préférence du type H4.

La zone peptide de transit comprend, dans le sens de la transcription, au moins un peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, une partie de la séquence de la partie mature

50 N-terminale d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, puis un second peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, de préférence le gène de la petite sous-unité de la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase (RuBisCO) selon la demande de brevet européen/ PCT 508 909. Cette zone caractéristique a comme rôle de permettre le relargage dans le comparti-

ment plastidial d'un polypeptide mature avec une efficacité maximale, de préférence sous forme native.

La séquence codante utilisable dans le gène chimère selon l'invention provient d'un gène de tolérance herbicide d'origine phylogénétique quelconque. Cette séquence peut être notamment celle de l'EPSPS mutée ayant un degré de tolérance au glyphosate.

5 La zone promotrice selon la demande de brevet européen/ PCT 507 698 peut être d'origine quelconque, sous forme simple ou dupliquée ou combinée d'un gène s'exprimant naturellement dans les plantes, c'est à dire, par exemple bactérienne telle que celle du gène de la nopaline synthase, ou virale telle que celle du transcrit 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur, ou de préférence végétale telle que celle de la petite sous-unité de la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase ou de préférence telle que celle d'un gène d'histone végétale et de préférence d'*Arabidopsis thaliana*. On utilise de préférence un gène d'histone du type H3
10 ou de préférence H4.

Le gène chimère selon l'invention peut comprendre, en plus des parties essentielles ci-dessus, une zone intermédiaire non traduite (linker) entre la zone promotrice et la zone codante ainsi qu'entre la zone codante et la zone terminatrice et qui peut être d'origine phylogénétique quelconque.

15

EXEMPLE 1: Construction de gènes chimères

On effectue la construction de gènes chimères selon l'invention à partir des éléments suivants:

20 1) Promoteur de gène d'histone: on isole le promoteur à partir d'un clone d'histone H4A748 d'*Arabidopsis thaliana* race Strasbourg (M.E. Chaboute, Thèse de l'Université de Strasbourg, 1987 et M.E.Chaboute *et al.* (1987) Plant Mol.Biol., 8, 179-191). Ce promoteur comprenant environ 900pb entre les sites Aval utilisés pour l'isoler a été sous-cloné au site Sall de pUC18 disponible sur catalogue (Pharmacia #27-4949-01) après remplissage des extrémités saillantes Sall et Aval par la polymérase de Klenow. L'un des sous-clones obtenu présentant l'extrémité 5' du promoteur proche du site HindIII du polylinker de pUC18 et l'extrémité 3' du promoteur proche du site XbaI du polylinker de pUC18 a été utilisé par la suite et nommé:
25 prom.H4A748/Aval/Sall-pUC18.

2) Zone peptide de transit: les deux peptides de transit ainsi que les éléments de protéine matures utilisés ont été décrits, de même que leur assemblage (M. Lebrun *et al.*, demande de brevet européen/PCT 508 909). Cette zone comprend environ 350pb et est nommée Peptide de Transit Optimisé (PTO).

30 3) Gène de tolérance herbicide CT7: il provient du gène muté CT7 (Pro1O1 en Ser) de l'EPSPS de *Salmonella thyphimurium* isolé par Stalker *et al.* (1985) J.Biol.Chem., 260, 4724-4728. Le clone pGM34-2, fourni par Calgene, a été linéarisé par XbaI puis traité par la nucléase de *Vigna radiata*. Après recoupage par SmaI, les deux extrémités franches ont été ligaturées. Le clone obtenu possède un site NcoI sur l'ATG initiateur de la traduction, ainsi qu'un site Sall à 17pb en aval du codon stop. Ce clone a été nommé pRPA-BL-104.
35

4) Fusion TPO/CT7: une cassette d'expression contenant le transit peptide optimisé(TPO) fusionné dans le cadre de lecture avec le gène CT7 (B.Leroux *et al.*, demande de brevet européen/ PCT 507 698) est clonée dans le vecteur pBSII SK(-) (catalogue Stratagene #212206). Cette cassette 5'-TPO/CT7-3' contient un site XbaI à son extrémité 5' et un site SstI à son extrémité 3'.

40 5) Gène rapporteur GUS: il s'agit du gène codant pour la β -glucuronidase(GUS) présent dans le plasmide pBI 101-1 disponible sur catalogue (Clontech #6017-1).

6) Zone terminatrice histone: elle est isolée à partir du gène d'histone H4A748 d'*Arabidopsis thaliana* (M.E.Chaboute, thèse de l'Université de Strasbourg, 1987 et M.E.Chaboute *et al.* (1987) Plant Mol.Biol., 8, 179-191). Un fragment Sau3AI de 661pb a été isolé, rendu à bords francs par traitement à la polymérase de Klenow et sous-cloné au site SmaI du phagemide pBluescript®II KS (+) disponible sur catalogue (Stratagene #212207). La séquence de ce fragment est présentée ci-dessous dans la section : "liste de séquence". Il a été montré par cartographie S1 que ce fragment isolé comprend à l'intérieur d'une région de 200 pb de son extrémité 5', dans le sens originel de la transcription, la séquence correspondant à celle présente avant le site de polyadénylation du mRNA dérivant de la transcription de ce gène. Le nucléotide A en position 165 de la séquence de 661pb correspondant au site d'addition de l'extrémité polyadénylée présente sur le transcrit (Chaboute M.E. *et al.* (1988) Gene, 71, 217-223). Deux sous-clones ont été conservés, qui présente l'un: l'insert orienté dans le sens originel de la transcription du gène H4A748 sous forme d'un fragment SstI-EcoRI et nommé t-directH4A748/Sau3AI/SmaI-pKS, et l'autre en sens inverse sous forme d'un fragment SstI-EcoRI et nommé t-inverseH4A748/Sau3AI/SmaI-pKS.
50

55 Séquence de 661pb du zone terminatrice d'histone H4A748 d'*Arabidopsis thaliana* dans le sens originel de la transcription du gène:

	GATCCGCGTT TGTGTTTTCT GGGTTTCTCA CTTAAGCGTC TGGGTTTTAC TTTTGTATTG	60
	GGTTTGGCGT TTAGTAGTTT GCGGTAGCGT TCTTGTATG TGTAATTACG CTTTTTCTTC	120
5	TTGCTTCAGC AGTTTCGGTT GAAATATAAA TCGAATCAAG TTTCACCTTA TCAGCGTTGT	180
	TTTAAATTTT GGCATTAAAT TGGTGAAAAT TGCTTCAATT TTGTATCTAA ATAGAGAGA	240
	CAACATGAAA TTCGACTTTT GACCTCAAAT CTTCGAACAT TTATTTCTCG ATTTCCAGAT	300
10	GGATGAGGAT AACGAAAGGG CGGTTCCCTAT GTCCGGGAAA GTTCCCGTAG AAGACATGA	360
	GCAAGCTAC TGAACGCGG ACACGACGTC GCATTGGTAC GGATATGACT TAAACCGACT	420
	CAATTCCTTT ATTAAGACAT AACCAGATT TGSTTAAAGT GTACAGTGA GCTGATATAA	480
	AACCGAAACA AACCGGTACA AGTTTGATTG AGCAACTTGA TGACAACTT CAGAATTTTG	540
15	GTTATTGAAT GAAAATCATA GTCTAATCGT AAAAAATGTA CAGAAGAAA GCTAGAGCAG	600
	AACAAAGATT CTATATTCTG GTTCCAATTT ATCATCGCTT TAACCTCCCT CAGATTIGAT	660
	C	661

20

7) Zone terminatrice "nos": il s'agit du fragment contenant le signal de zone terminatrice du gène de la nopaline synthase(nos) de pTi37 (Bevan M.*et al.* (1983) Nucl.Acids Res., 11, 369-385) présent sur le plasmide pBI 101-1 disponible sur catalogue (Clontech #6017-1).

L'assemblage de tous ces éléments a été effectué de la façon suivante sur la base du squelette du vecteur binaire pour la transformation des plantes via *Agrobacterium tumefaciens*, pBI 101-1 disponible sur catalogue (Clontech #6017-1):

Construction de pRA-1:

Le promoteur histone H4A748 d'*Arabidopsis thaliana* a été excisé du plasmide prom.H4A748/Aval/Sall-pUC18 sous forme du fragment HindIII/XbaI de environ 900pb. Ce fragment a été inséré par ligation dans le plasmide pBI 101-1 digéré par HindIII/XbaI. Le plasmide recombinant obtenu contient, dans le sens de la transcription du gène chimère: promoteur H4A748/GUS/zone terminatrice nos et a été nommé pRA-1.

Construction de pRA-2:

Le zone terminatrice H4A748 d'*Arabidopsis thaliana* a été excisé du plasmide t-directH4A748/Sau3AI/SmaI-pKS sous forme d'un fragment SstI/EcoRI d'environ 670pb. Ce fragment a été inséré par ligation en substitution du zone terminatrice nos après digestion du plasmide pRA-1 par SstI/EcoRI. Le plasmide recombinant obtenu contient, dans le sens de la transcription du gène chimère: promoteur H4A748/GUS/zone terminatrice H4A748 en orientation directe et a été nommé pRA-2.

Construction de pRA-3:

Le zone terminatrice H4A748 d'*Arabidopsis thaliana* a été excisé du plasmide t-inverseH4A748/Sau3AI/SmaI-pKS sous forme d'un fragment SstI/EcoRI d'environ 670pb. Ce fragment a été inséré par ligation en substitution du zone terminatrice nos après digestion du plasmide pRA-1 par SstI/EcoRI. Le plasmide recombinant obtenu contient, dans le sens de la transcription du gène chimère: promoteur H4A748/GUS/zone terminatrice H4A748 en orientation inverse et a été nommé pRA-3.

50

Construction de pRPA-RD-146:

Le fragment XbaI/SstI d'environ 1,75kpb contenant PTO/CT7 a été inséré par ligation en substitution du gène GUS après digestion du plasmide pRA-1 par XbaI/SstI. Le plasmide recombinant obtenu contient, dans le sens de la transcription du gène chimère: promoteur H4A748/PTO/CT7/zone terminatrice nos et a été nommé pRPA-RD-146.

55

Construction de pRPA-RD-147:

Le fragment XbaI/SstI d'environ 1,75kpb contenant PTO/CT7 a été inséré par ligation en substitution du gène GUS après digestion du plasmide pRA-2 par XbaI/SstI. Le plasmide recombinant obtenu contient, dans le sens de la transcription du gène chimère: promoteur H4A748/PTO/CT7/zone terminatrice H4A748 en orientation directe et a été nommé pRPA-RD-147.

Construction de pRPA-RD-148:

Le fragment XbaI/SstI d'environ 1,75kpb contenant PTO/CT7 a été inséré par ligation en substitution du gène GUS après digestion du plasmide pRA-3 par XbaI/SstI. Le plasmide recombinant obtenu contient, dans le sens de la transcription du gène chimère: promoteur H4A748/PTO/CT7/zone terminatrice H4A748 en orientation inverse et a été nommé pRPA-RD-148.

EXEMPLE 2: Expression de l'activité d'un gène rapporteur

1) Transformation et régénération

Le vecteur est introduit dans la souche non oncogène d'*Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 disponible sur catalogue (Clontech #6027-1) par croisement triparental à l'aide du plasmide "helper" pRK 2013 dans *Escherichia coli* HB101 selon la procédure décrite par Bevan M. (1984) Nucl.Acids Res., 12, 8711-8721.

La technique de transformation à partir d'explants racinaires d'*Arabidopsis thaliana* L.-écotype C24 a été effectuée selon la procédure décrite par Valvekens D. et al. (1988) Proc.Natl.Acad.Sci USA, 85, 5536-5540. Brièvement, 3 étapes sont nécessaires: induction de la formation des cals sur milieu B5 de Gamborg complé- menté de 2,4-D et de kinétine; formation de bourgeons sur milieu B5 de Gamborg complé- menté de 2iP et d'IAA; enracinement et formation de graines sur MS sans hormones.

2) Mesure de l'activité GUS dans les plantes

a- observations histochimiques

La révélation de l'activité GUS (Jefferson R.A. et al. (1987) EMBO J., 6, 3901-3907) sur différents organes de plantes transgéniques montre que l'expression préférentielle dans les régions méristématiques est conservée avec les constructions pRA-2 et 3. De plus, la construction pRA-2 permet d'observer une activité dans les tissus adultes (feuilles, racines, hampes florales) qui n'apparaît pas avec la construction pRA-1.

b- mesures fluorométriques

L'activité GUS a été mesurée par fluorométrie sur des extraits de bourgeons floraux et de feuilles de la rosette (Jefferson R.A. et al. (1987) EMBO J., 6, 3901-3907) à partir de 12 plantes, correspondant à des événements individuels de transformation, pour chacune des constructions pRA-1, 2 et 3.

Les résultats moyens calculés, en pmol MU/min.mg prot., sont les suivants:

<u>Constructions</u>	<u>Feuilles (F)</u>	<u>Bourgeons (B)</u>	<u>Rapports B/F</u>
pRA-1	850,25	3965,33	4,66
pRA-2	4890,67	33683,75	6,89
pRA-3	4211,73	27752,45	6,59

Ces mesures montrent clairement que la zone terminatrice H4A748 en sens direct ou inverse induit une augmentation de l'activité de l'expression du gène chimère, en particulier dans les régions de la plante en croissance rapide.

EXEMPLE 3: Tolérance de plantes transgéniques à un herbicide**1) Transformation et régénération**

Le vecteur est introduit dans la souche non oncogène d'*Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 disponible sur catalogue (Clontech #6027-1) par croisement triparental à l'aide du plasmide "helper" pRK 2013 dans *Escherichia coli* HB101 selon la procédure décrite par Bevan M. (1984) Nucl.Acids Res., **12**, 8711-8721.

La technique de transformation à partir d'explants foliaires de tabac est basée sur la procédure décrite par Horsh R. et al. (1985) Science, **227**, 1229-1231. La régénération du tabac PBD6 (provenance SEITA-France) à partir d'explants foliaires est réalisée sur un milieu de base Murashige et Skoog (MS) comprenant 30g/l de saccharose ainsi que 200µg/ml de kanamycine en trois étapes successives: la première comprend l'induction des pousses sur un milieu MS additionné de 30g de saccharose contenant 0,05mg d'acide naphthylacétique (ANA) et 2mg/l de benzylaminopurine (BAP) pendant 15 jours. Les pousses formées au cours de cette étape sont ensuite développées par culture sur un milieu MS additionné de 30g/l de saccharose mais ne contenant pas d'hormone, pendant 10 jours. Puis on prélève des pousses développées et on les cultive sur un milieu d'enracinement MS dilué au demi, à teneur moitié en sels, vitamines et sucres et ne contenant pas d'hormone. Au bout d'environ 15 jours, les pousses enracinées sont passées en terre.

2) Mesure de la tolérance au glyphosate:

Vingt plantes transformées ont été régénérées et passées en serre pour chacune des constructions pRPA-RD-A, B et C. Ces plantes ont été traitées en serre au stade 5 feuilles avec une suspension aqueuse de RoundUp correspondant à 0,8kg de matière active glyphosate par hectare.

Les résultats correspondent à l'observation d'indices de phytotoxicité relevés 3 semaine après traitement. Dans ces conditions, on constate que les plantes transformées par les constructions présentent en moyenne une tolérance acceptable (pRPA-RD-146) voire bonne (pRPA-RD-147 et 148) alors que les plantes témoins non transformées sont complètement détruites.

Ces résultats montrent clairement l'amélioration apportée par l'utilisation d'un gène chimère selon l'invention pour un même gène codant pour la tolérance au glyphosate.

Les plantes transformées selon l'invention peuvent être utilisées comme parents pour l'obtention de lignées et d'hybrides ayant le caractère phénotypique correspondant à l'expression du gène chimère introduit.

Revendications

1) Séquence ADN isolée pouvant servir de zone terminatrice dans un gène chimère utilisable pour la transformation des plantes, caractérisée en ce qu'elle comprend dans le sens de la transcription du gène chimère, au moins une zone terminatrice d'un gène d'histone végétale permettant l'expression du produit de traduction du gène chimère en particulier dans les régions de la plante en croissance rapide.

2) Séquence ADN selon la revendication 1, caractérisée en ce que la zone terminatrice est orientée, dans le sens de la transcription du gène chimère, de façon directe ou inversée relativement à son orientation initiale dans le sens de la transcription du gène dont elle est issue.

3) Séquence ADN selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisée en ce que la zone terminatrice d'histone provient d'une plante dicotylédone.

4) Séquence ADN selon la revendication 3, caractérisée en ce que la zone terminatrice d'histone provient d'*Arabidopsis thaliana*.

5) Séquence ADN selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisée en ce que la zone terminatrice d'histone provient d'une plante monocotylédone.

6) Séquence ADN selon la revendication 5, caractérisée en ce que la zone terminatrice d'histone provient de *Zea mays*.

7) Séquence ADN selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que la zone terminatrice d'histone provient d'un gène d'histone végétale H4.

8) Séquence ADN selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que la zone terminatrice d'histone provient d'un gène d'histone végétale H3.

9) Séquence ADN selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que la zone terminatrice comprend plusieurs éléments de zone terminatrice associés.

10) Séquence ADN selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que la zone terminatrice comprend une zone terminatrice de gène d'histone associé à une zone terminatrice d'un gène pouvant s'exprimer

naturellement dans les plantes.

11) Séquence ADN selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisée en ce qu'elle permet l'expression du produit d'un gène de tolérance herbicide dans les zones d'accumulation dudit herbicide dans la plante.

5 **12)** Gène chimère pour la transformation des plantes comprenant au moins, dans le sens de la transcription, une zone promotrice, une séquence d'un gène de tolérance herbicide et une zone terminatrice, caractérisé en ce que la zone terminatrice comporte une séquence selon l'une des revendications 1 à 11.

13) Gène chimère selon la revendication 12, caractérisé en ce que la zone promotrice provient d'un promoteur de gène d'histone végétale.

10 **14)** Gène chimère selon l'une des revendications 12 et 13, caractérisé en ce que la zone promotrice provient du même gène d'histone végétale que le zone terminatrice.

15) Gène chimère selon l'une des revendications 12 à 14, caractérisé en ce que la zone promotrice comprend un promoteur d'histone végétale dupliqué.

15 **16)** Gène chimère selon l'une des revendications 12 à 15, caractérisé en ce que la zone promotrice contient au moins un promoteur d'un gène d'histone végétale associé à un promoteur différent issu d'un gène pouvant s'exprimer naturellement dans les plantes.

17) Gène chimère selon l'une des revendications 12 à 16, caractérisé en ce que le gène codant permet de conférer aux plantes une tolérance accrue vis à vis d'un herbicide.

20 **18)** Gène chimère selon la revendication 17, caractérisé en ce que le gène de tolérance herbicide est fusionné à une séquence ADN codant pour une zone peptide de transit permettant l'accumulation du produit de la traduction du gène de tolérance herbicide dans un compartiment subcellulaire.

19) Gène chimère selon la revendication 18, caractérisé en ce que la zone peptide de transit permet l'accumulation du produit de la traduction du gène de tolérance herbicide dans le compartiment plastidial.

25 **20)** Gène chimère selon la revendication 18, caractérisé en ce que la zone peptide de transit comprend, dans le sens de la transcription, au moins un peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, éventuellement une partie de séquence de la partie mature N-terminale d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, puis éventuellement un second peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale.

21) Gène chimère selon l'une des revendications 13 à 20, caractérisé en ce que le gène de tolérance herbicide code pour une enzyme active vis à vis d'herbicides dont la cible est l'EPSPS.

30 **22)** Gène chimère selon la revendication 21, caractérisé en ce que le gène de tolérance herbicide code pour une enzyme active vis à vis du glyphosate.

23) Gène chimère selon la revendication 21, caractérisé en ce que le gène de tolérance herbicide est d'origine phylogénétique quelconque.

35 **24)** Vecteur pour la transformation des plantes, caractérisé en ce qu'il comprend un gène chimère selon l'une des revendications 13 à 23

25) Souche d'*Agrobacterium* sp., caractérisée en ce qu'elle contient un vecteur selon la revendication 23.

26) Cellule végétale transformée, caractérisée en ce qu'elle contient un gène chimère selon l'une des revendications 12 à 23.

27) Plante transformée obtenue à partir d'une cellule selon la revendication 26.

40 **28)** Procédé de construction d'un gène chimère selon l'une des revendications 13 à 23, caractérisé en ce qu'on isole respectivement un zone terminatrice d'un gène d'histone végétale selon l'une des revendications 1 à 9, au moins une zone peptide de transit, ainsi qu'au moins un transgène et une zone promotrice et que ensuite on les assemble dans le sens de la transcription du transgène.

45

50

55



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numero de la demande
EP 94 42 0177

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.5)
A	GENE, vol.71, 1988, AMSTERDAM NL pages 217 - 223 CHABOUTE, M.-E., ET AL. 'Polyadenylation of histone H3 and H4 mRNAs in dicotyledonous plants' * figure 4 *	1-28	C12N15/82 C12N15/29 C12N5/00 C12N1/21 A01H5/00
A	PLANT MOLECULAR BIOLOGY, vol.8, 1987, DORDRECHT, THE NETHERLANDS. pages 179 - 191 CHABOUTE, M.E., ET AL. 'Genomic organization and nucleotide sequences of two histone H3 and two histone H4 genes of Arabidopsis thaliana' * le document en entier *	1-28	
A	BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. 88 1989, Philadelphia, PA, US; abstract no. 119487, NAKAYAMA, T., ET AL. 'Cis-acting sequences that modulate transcription of wheat histone H3 gene and 3' processing of H3 premature messenger RNA' * abrégé * & PLANT CELL PHYSIOL., vol.30, no.6, 1989 pages 825 - 832	1-28	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.5) C12N A01H
A	THE PLANT JOURNAL, vol.2, no.3, 1992 pages 291 - 300 ATANASSOVA, R., ET AL. 'A 126 bp fragment of a plant histone gene promoter confers preferential expression in meristems of transgenic Arabidopsis' * page 298, colonne de droite *	1-28	
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 18 Octobre 1994	Examineur Maddox, A
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons Δ : membre de la même famille, document correspondant	

EPO FORM 1503 (03/92) (PMA/002)



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numero de la demande
EP 94 42 0177

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.5)
A	MOL. GEN. GENET., vol.231, 1992 pages 276 - 285 LEPETIT, M., ET AL. 'A plant histone gene promoter can direct both replication-dependent and -independent gene expression in transgenic plants' * page 284, colonne de gauche *	1-28	
A	EP-A-0 507 698 (RHONE-POULENC) 7 Octobre 1992 * le document en entier *	1-28	
A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol.16, no.4, 1988 pages 1295 - 1304 CHAUBET, N., ET AL. 'The histone H3 and H4 mRNAs are polyadenylated in maize' * le document en entier *	7	
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.5)
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 18 Octobre 1994	Examineur Maddox, A
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

EPO FORM 1503 03.92 (P0402)